

Cinética ruminal y crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido-lácticas

Ruminal kinetics and growth of kids supplemented with a lactic acid bacteria probiotic

M.A. Galina¹, M. Delgado-Pertiñez², M.A. Ortiz-Rubio¹, L.J. Pineda³ y D.C. Puga⁴

¹Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Universidad Nacional Autónoma de México, México

E-mail: miguelgalina@correo.unam.mx

²EUITA-Universidad de Sevilla, España

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima, México.

⁴Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México

Resumen

Con el objetivo de evaluar la cinética ruminal y el crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido-lácticas, se asignaron 86 animales Alpinos en un experimento durante 120 días. En el tratamiento uno (T1) 43 cabritos recibieron una dieta constituida por 50% de heno de alfalfa, 40% de concentrado comercial y 10% de alimento nitrogenado de lento consumo (DI). Los animales del tratamiento dos (T2) recibieron DI rociada diariamente con 50 mL de probiótico (BAL) por kilogramo de MS. Se determinó la desaparición de MS *in situ*, el consumo voluntario de MS, la degradación de la fibra, la concentración de NH₃ y AGV, la digestibilidad *in vivo*, el pH ruminal, los derivados de purinas y la ganancia de peso. La ganancia de peso diaria fue de 129 y 169 g para T1 y T2, respectivamente (P<0,05). El NH₃ y la digestibilidad del N y de la fibra fueron mayores para T2 (P<0,05). El tiempo medio de desaparición de la hemicelulosa fue mayor (P<0,05) en T2. Los conteos totales BAL fueron 1,6 y 2,5 millones de ufc/mL en T1 los días 1 y 7. Los cabritos del T2 presentaron 2,4 y 12,5 millones de ufc/mL. Se concluye que la adición de BAL a la dieta para cabritos en crecimiento puede incrementar la ganancia de peso vivo, así como se producen cambios favorables en la digestibilidad, la proteína microbiana y la cinética ruminal.

Palabras clave: Bacterias acidolácticas, cabritos, probióticos

Abstract

With the objective of evaluating the ruminal kinetics and growth of kids supplemented with a lactic acid bacteria (LAB) probiotic, 86 Alpine animals were assigned to a trial for 120 days. In treatment 1 (T1), 43 kids received a diet constituted by 50% alfalfa hay, 40% commercial concentrate and 10% slow intake nitrogen feed (ID). The animals in treatment two (T2) received ID daily sprayed with 50 mL probiotic (LAB) per kilogram of DM. *In situ* DM disappearance, voluntary DM intake, fiber degradation, NH₃ and VFA concentration, *in vivo* digestibility, ruminal pH, purine derivatives and weight gain were determined. The daily weight gain was 129 and 169 g for T1 and T2, respectively (P<0,05). NH₃ and N and fiber digestibility were higher for T2 (P<0,05). The half-time disappearance of hemicellulose was higher (P<0,05) for T2. The total LAB counts were 1,6 and 2,5 million fcu/mL in T1 on days 1 and 7. The kids in T2 showed 2,4 and 12,5 million fcu/mL. It is concluded that the addition of LAB to the diet for growing kids can increase live weight gain, as well as produce favorable changes in digestibility, microbial protein and ruminal kinetics.

Key words: Lactic acid bacteria, goat kids, probiotics

Introducción

Los agricultores orgánicos, los medioambientalistas y la comunidad científica preocupada por el bienestar animal, enfrentan desafíos en la prevención y el control de enfermedades en los animales domésticos y en el

fortalecimiento de la producción, debido a la prohibición del uso de medicamentos y aditivos químicos (Patra *et al.*, 2009). En este sentido, los probióticos constituyen una alternativa (Ortiz *et al.*, 2009).

Los probióticos contienen levaduras, bacterias ácido-lácticas, hongos, cultivo de *Bacillus subtilis*, estreptococos y/o la mezcla de los anteriores (Nocek *et al.*, 2002; 2003). Las bacterias ácido-lácticas, que incluyen el género *Lactobacilli*, son las bacterias probióticas administradas con mayor frecuencia (Brashears *et al.*, 2003); estas son residentes normales del tracto gastrointestinal y a menudo se consideran sustitutos naturales de los antibióticos alimentarios (Reid y Friendship, 2002).

Los animales suplementados con probióticos de bacterias lácticas (BAL) muestran un incremento en la eficiencia de la utilización del alimento y la resistencia a las enfermedades (Ortiz *et al.*, 2009). Recientemente, los probióticos y los prebióticos han recibido atención, por su papel en el control de las enfermedades infecciosas y el mejoramiento de la productividad en bovinos lecheros (Galina *et al.*, 2009). Generalmente las bacterias productoras de ácido láctico han probado su eficiencia como probióticos y se han utilizado como promotores del crecimiento, para prevenir infecciones intestinales, disminuir el estrés, estimular la respuesta inmune y aumentar la producción de leche (Couret *et al.*, 2004; Galina *et al.*, 2009).

Las bacterias benefactoras, como las *bifido*-bacterias, los *lactobacilli* y algunas especies de *enterococci*, proveen de nutrientes a las células intestinales, lo que estimula la absorción de nutrientes, crea un ambiente intestinal saludable y promueve un vigoroso sistema inmune (Czarnecki-Maulden, 2008).

Con mayor especificidad, se reportó que los simbióticos (combinaciones de prebióticos y probióticos), mezclados en el alimento, mejoran la producción de leche en vacas Holstein. Además inhiben el crecimiento de *salmonella* y previenen la diarrea, mientras aumentan la ganancia de peso en becerros (Yasuda *et al.*, 2007).

Se ha discutido que el uso de probióticos lácticos en los rumiantes aumenta las concentraciones de amoníaco en el rumen, incrementa la digestibilidad del nitrógeno y de la fibra, además de favorecer mayores conteos de lactobacilos, hasta 12,5 millones de ufc/mL de contenido ruminal, en comparación con la cantidad normal de 1,5 millones/mL (Ortiz *et al.*, 2009); también se registran cantidades superiores de purinas. El mejor comportamiento de los animales alimentados con probióticos puede explicarse por una disminución de la metanogénesis, lo que conserva la energía para el desarrollo animal (Ortiz *et al.*, 2009). La producción de proteína microbiana a través de bacterias probióticas es una tecnología desarrollada para incrementar la cantidad y la calidad de la proteína y la energía enviadas al intestino delgado (Ortiz *et al.*, 2009).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la cinética ruminal y el crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido-lácticas.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en Querétaro, México. Durante 120 días se utilizaron 86 cabritos de raza Alpina, de 20,4 (\pm 0,5) kg de peso corporal (PC), sin distinción de sexo, distribuidos en un diseño completamente al azar, en dos tratamientos: T1): 43 cabritos (20,7 \pm 0,7 kg PC) alimentados con una dieta integral (DI) de 50% de heno de alfalfa, 40% de concentrado y 10% de un suplemento nitrogenado de lento consumo (SNLC) (Galina *et al.*, 2007) y T2): 43 cabritos (20,9 \pm 0,4 kg PC) alimentados con la DI rociada diariamente con 50 mL/kg de MS de probiótico (BAL), formado por una mezcla de suero de quesería, melaza, urea, sulfato amónico y un cultivo de bacterias lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidus esscencis* y *Saccharomyces cerevisiae*) diluidas en agua. Se realizaron los análisis químicos de los alimentos de acuerdo con la metodología del AOAC (1995), cuyos resultados se muestran en la tabla 1.

Los animales se alojaron en corrales separados y permanecieron en estabulación durante el período experimental (120 días), con agua a libre acceso; el alimento se ofreció dos veces por día, a las 8:00 y a las 14:00 h., ajustando la oferta para asegurar un 15% de rechazo. Los cabritos se pesaron mensualmente; el consumo de alimento se midió tres veces a la semana, pesando el alimento ofrecido con relación al rechazado.

Tabla 1. Análisis químico proximal de la alfalfa (A), el concentrado comercial (CC) y el probiótico (BAL) ofrecido a los cabritos.

Table 1. Proximal chemical analysis of alfalfa (A), the commercial concentrate (CC) and the LAB probiotic fed to the kids.

	A (%)	CC (%)	BAL (%)
MS	89,6	89,2	22,45
Cenizas	9,70	21,9	19,14
Extracto etéreo	2,70	9,80	9,90
CP (N x 6,25)	16,2	18,0	27,2
FDN	55,1	36,5	
FDA	39,7	13,4	
Hemicelulosa	27,2	20,4	
NFE	40,1	58,3	
EM (Mcal/kg MS)	2,39	2,99	3,61

Se utilizaron cuatro cabras fistuladas para el estudio de la cinética ruminal, bajo un diseño de cuadrado latino (4 x 2), a las cuales se les ofrecieron los dos tratamientos en evaluación. Cada animal tuvo 15 días de adaptación a la dieta y cinco días para la toma de muestras.

La degradabilidad *in situ* se realizó mediante la técnica de bolsa de nailon (Ørskov *et al.*, 1980); se utilizaron bolsas de poliéster, de 7 x 15 cm, con 1 600 poros/cm², de la marca Ankom, con un tamaño de poro de 3 mm. Dentro de las bolsas, se colocaron 3 g de muestra de rastrojo de maíz como forraje de referencia para los estudios de digestibilidad (Galina *et al.*, 2004). Las bolsas fueron colocadas dentro del rumen a intervalos de 8, 16, 24, 48, 72 y 96 horas. Al final del tiempo de incubación, el material fue retirado del rumen para ser lavado durante períodos de 10 minutos en un agitador mecánico, hasta que el fluido fue transparente; posteriormente se secó a 65°C durante 48 horas. Al material residual se le determinó el contenido de MS y las fracciones de la fibra. Las bolsas correspondientes a la hora cero, únicamente fueron lavadas para determinar la cantidad de material soluble en la muestra. Para interpretar los datos se utilizó la ecuación sugerida por McDonald (1981) y Dhanoa (1988), la cual surge de la ecuación: $P_t = a + b(1 - e^{-ct})$ propuesta por Ørskov y McDonald (1979), donde:

Pt = igual que Yt

Yt = $W_0 + Bd(1 - e^{-c(t-L)})$

Yt = Pérdida en tiempo 't', horas

W₀ = residuos del lavado a tiempo 0; el tiempo cero incluye las pérdidas por el lavado de material soluble y partículas pequeñas.

Bd = es el material insoluble pero potencialmente degradable

e = exponencial

c = es la tasa fraccionada constante del exponencial. El exponencial es una escala de b, por lo tanto b y c juntos definen la degradación del forraje

t = Tiempo

Digestibilidad in vivo. Se recolectaron las heces durante un período de cinco días, tomando un alícuota de 25% para su procesamiento. Las heces se secaron en una estufa de aire forzado a 70°C por 36 h, y se almacenaron en botellas herméticas hasta su análisis. Se determinó la MS, el N, la MO, la FND, la celulosa y

la hemicelulosa. Además se recolectó la excreción total de orina durante cinco días, agregando ácido sulfúrico (10%) para mantener el pH por debajo de 3; después se tomaron muestras de 100 mL y se congelaron a -20°C hasta los análisis. Se midió la velocidad de pasaje con la fibra Cr-mordante, dada a través de la aplicación del Cr-mordante en el alimento y la recuperada en las heces, en un período de tiempo de 24 y 48 h.

Determinaciones de pH, NH_3 y AGV. Se extrajeron muestras de fluido ruminal (50 mL) a las 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 22 horas, mediante una cánula en el rumen, las cuales se filtraron a través de dos capas de gasa y se mantuvieron en un termo previamente gaseado con CO_2 . En el laboratorio se transfirieron a botellas más pequeñas mientras se gasificaban con CO_2 . Estas fueron almacenadas en una incubadora a 39°C ; el fluido ruminal fue diluido (10^6 - 10^8) y se inocularon e incubaron 0,5 mL de cada una de las tres disoluciones; después se contaron las colonias según la técnica descrita por Hungate (1969). Se utilizó una submuestra de este fluido para medir el pH con un potenciómetro portátil; mientras que el NH_3 se determinó en forma directa, ya que en solución acuosa el amoníaco se encuentra en su forma ionizada (NH_4^+), a través de un electrodo específico para este ión (marca Orion). La medición se llevó a cabo a diferentes intervalos: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y progresivamente hasta las 96 horas del primer día del período experimental; se filtró a través de tres paños de gasa para obtener una muestra libre de partículas sólidas; para evitar la pérdida del compuesto se adicionó de tres a cuatro gotas de HCl a 0,2 N por cada 10 mL de líquido filtrado. Los AGV totales se determinaron mediante la cromatografía de gases, así como sus proporciones molares.

Análisis químico. La determinación de las fracciones de fibra se realizó de acuerdo con la metodología de Goering y VanSoest (1970), y la MS, la MO y el N, por la AOAC (1995). El valor de energía bruta (Mcal/kg) de las dietas y las muestras fecales se determinó con un calorímetro de bomba adiabática.

Análisis matemático. Los resultados de la cinética ruminal se analizaron mediante un análisis de varianza y las diferencias entre medias fueron evaluadas con la prueba de Tukey ($P < 0,05$); mientras que se utilizó el test de Student para comparar las diferencias de las cabras canuladas de las dietas T1 y T2, con el programa SAS (1996).

Resultados y Discusión

Los cabritos suplementados con probiótico (T2) mostraron un mejor crecimiento ($P < 0,05$), manifestado en un mayor peso corporal (169 g en comparación con 129 g/d para los cabritos control en la dieta T1 (tabla 2). Estos resultados están en concordancia con la investigación realizada en cabras maltesas en crecimiento que recibieron *Lactobacilli*, las cuales tuvieron mayores ganancias de peso corporal que el control (Chiofalo *et al.*, 2004). Los incrementos en la tasa de degradabilidad, en la proteína microbiana y en la digestibilidad de la fibra pueden explicar los resultados. Además, el consumo de MS y N fue mayor en T2 en comparación con T1 ($P < 0,05$).

El pH ruminal (tabla 2) no mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos. No obstante, la cantidad de concentrado (45%) en la dieta T1 pudiera explicar la disminución del pH, debido a la formación de AGV cuyos valores fueron de 6,2; mientras que la utilización efectiva del ácido láctico pudo influir en la moderación de la acidez en el T2.

La estabilización del pH se asocia generalmente con la disminución de los niveles de ácido láctico en el rumen. A pesar de que se aumentó la concentración de los *Lactobacilli*, los cuales incrementan la concentración de ácido láctico ruminal, al parecer este se utilizó como sustrato para el crecimiento de bacterias ruminales que transforman el ácido láctico en propiónico, con la correspondiente moderación del pH ruminal (Galina *et al.*, 2009).

El tratamiento con probióticos BAL de la dieta T2 tarjo consigo mayores concentraciones de amoníaco ruminal (tabla 2) en comparación con T1.

Tabla 2. Crecimiento, consumo, digestibilidad e indicadores ruminales en los cabritos.

Table 2. Growth, intake, digestibility and ruminal indicators in the kids.

	T1	T2
Crecimiento		
PV día 1	20,7±200	20,9±150
PV día 120	36,2±120	41,2±130
Ganancia diaria de peso (kg)	0,129 ± 0,022 ^b	0,169±0,018 ^a
Ingestión, digestibilidad y metabolismo del N <i>in vivo</i>		
CV A (kg MS/d)	1,120 ± 0,150 ^b	1,312±0,156 ^a
Digestibilidad <i>in vivo</i> de la MS (%)	84,5 ± 2,83	87,41 ± 1,83
Digestibilidad <i>in vivo</i> de la MO (%)	93,25 ± 0,43	91,96 ± 0,78
Consumo de N (g/día)	118,6 ± 3,31 ^b	146,0 ± 1,63 ^a
N fecal (g/día)	22,4 ± 1,03 ^b	33,7 ± 2,65 ^a
N urinario (g/día)	52,3 ± 2,32 ^b	82,5 ± 2,69 ^a
N reterido (g/día)	50,3 ± 1,84 ^b	59,8 ± 1,52 ^a
Digestibilidad <i>in vivo</i> del N (%)	57,6 ± 1,50 ^b	80,2 ± 1,51 ^a
Determinaciones en el rumen		
NH ₃ ruminal (mg/100 mL)	14,9 ± 2,42 ^b	17,9 ± 2,91 ^a
pH del rumen	6,10 ± 0,29	6,54 ± 0,30
AGV del rumen (moles/100 moles)		
Acetato	78,2 ^a	72,2 ^b
Propionato	14,4 ^b	16,0 ^a
Butirato	5,3 ^b	8,6 ^a
Total	97,9	96,8

^{a,b} Medias con letras distintas muestran diferencias significativas (P<0,05) entre tratamientos

Satter y Slyter (1974) sugirieron una concentración de 3-5 mg de NH₃/100 mL de líquido ruminal como óptima para aumentar el crecimiento de los microorganismos ruminales; los resultados del presente trabajo cubren fácilmente los requerimientos de concentración de amoníaco sugeridos (14 vs 17 mg/100 mL) en T1 y T2, respectivamente.

La digestibilidad *in vivo* de la MS y la MO no difirió entre las dietas (tabla 2); en sentido general la digestibilidad de la alfalfa y de los concentrados es alta, debido a los bajos contenidos de la pared celular.

La velocidad de pasaje de la FND (K_p/h) fue mayor (P<0,05) en T2 (0,061/h y 0,082/h para el T1 y T2, respectivamente). La digestibilidad verdadera de la FND fue superior (P<0,05) en T2 (47,73%) con respecto al T1 (38,31%) (tabla 3). En el tratamiento con probióticos las mayores poblaciones microbianas de bacterias ácido-lácticas pudieron incrementar la utilización de la fibra (con el aumento de la velocidad de pasaje) y el consumo de MS, lo cual se manifestó en un mayor crecimiento de los cabritos.

Nocek *et al.* (2002; 2003) demostraron que el tratamiento con probióticos (lactobacilos y cultivo en levadura) incrementa el número de bacterias celulolíticas en el rumen y, en algunos casos, aumenta la degradación de la celulosa. En este sentido, la tasa de digestión para la hemicelulosa fue mayor en T2 que en T1 (P<0,05), mientras que las diferencias en la velocidad de digestión para la celulosa no fueron significativas (tabla 3). Sin embargo, la digestibilidad verdadera de la celulosa y la hemicelulosa fue mayor en T2 con respecto a T1 (P<0,05). La desaparición en tiempo medio (t ½) para la hemicelulosa fue mayor (P<0,05) en T2 (32,03 h) con relación a T1 (17,37 h), pero no para la celulosa (tabla 3).

Tabla 3. Potencial digestible e indigestible de las fracciones de la FDN, la celulosa y la hemicelulosa en las dietas.

Table 3. Digestible and indigestible potential of the fractions of NDF, cellulose and hemicellulose in the diets.

	FDN	
	T1	T2
Potencial digestible de fibra (b) (%)	62,45 ± 3,1	66,03 ± 1,9
Fracción soluble (a) (%)	6,06 ± 0,5	6,07 ± 0,3
Fracción indigestible (100-(a+b)) (%)	31,49 ± 3,25	27,90 ± 3,7
Tasa de paso (k_p/h)	0,061 ± 0,004 ^b	0,082 ± 0,015 ^a
Tasa de digestibilidad (k_d/h)	0,035 ± 0,003	0,039 ± 0,034
Digestibilidad verdadera ($k_d/k_d + k_p$) (%)	38,31 ± 3,12	37,73 ± 2,62
Tiempo medio de desaparición $t_{1/2}$ (h)	23,16 ± 2,97	20,16 ± 1,68

	Celulosa	
	T1	T2
Potencial digestible de fibra (b) (%)	67,89 ± 3,45 ^b	78,9 ± 2,87 ^a
Fracción soluble (a) (%)	3,97 ± 1,9 ^b	6,78 ± 2,1 ^a
Fracción indigestible (100-(a+b)) (%)	28,14 ± 2,54 ^a	14,32 ± 2,9 ^b
Tasa de paso (k_p/h)	0,057 ± 0,003	0,068 ± 0,016
Tasa de digestibilidad (k_d/h)	0,063 ± 0,002	0,068 ± 0,003
Digestibilidad verdadera ($k_d/k_d + k_p$) (%)	48,65 ± 1,23 ^b	57,48 ± 1,03 ^a
Tiempo medio de desaparición $t_{1/2}$ (h)	21,45 ± 3,15 ^b	16,21 ± 2,94 ^a

	Hemicelulosa	
	T1	T2
Potencial digestible de fibra (b) (%)	57,17 ± 5,24 ^b	66,18 ± 4,65 ^a
Fracción soluble (a) (%)	4,82 ± 1,6	4,9 ± 1,9
Fracción indigestible (100-(a+b)) (%)	38,01 ± 3,1 ^a	28,92 ± 2,4 ^b
Tasa de paso (k_p/h)	0,049 ± 0,002 ^a	0,037 ± 0,002 ^b
Tasa de digestibilidad (k_d/h)	0,059 ± 0,004 ^b	0,064 ± 0,003 ^a
Digestibilidad verdadera ($k_d/k_d + k_p$) (%)	37,54 ± 2,1 ^b	42,51 ± 2,2 ^a
Tiempo medio de desaparición $t_{1/2}$ (h)	17,37 ± 3,34 ^b	32,03 ± 2,01 ^a

^{a,b}Medias con letras distintas, muestran diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05)

Newbold *et al.* (1995) sugirieron que *A. oryzae* y *S. cerevisiae* estimularon la velocidad de la digestión de la fibra por los microorganismos ruminales.

El incremento del uso de la celulosa y la hemicelulosa probablemente se debió a una mayor degradación de las paredes celulares, por la explosión de la población microbiana ruminal y la acción de las bacterias lácticas. Sin embargo, se necesitan estudios más profundos sobre el efecto específico de las bacterias lácticas en la digestión de la fibra en cabras.

La excreción de derivados de las purinas (DP) en la orina ($\mu\text{mol}/\text{W}^{0,75}$) fue afectada (P<0,05) por la adición de los probióticos lácticos a la dieta T2 (tabla 4). Aunque no se ha encontrado información disponible sobre el efecto de las bacterias lácticas en la excreción de DP en cabritos, ello pudiera explicar el incremento de estas, lo cual se manifestó en una explosión de la proteína microbiana digerible en el intestino.

La proteína bacteriana puede ser una gran porción de la proteína total necesitada por un rumiante cuando mejora la fermentación microbiana (Galina *et al.*, 2007; Galina *et al.*, 2009), como se demostró anteriormente.

Tabla 4. Excreción urinaria de derivados de las purinas (DP) ($\mu\text{mol}/\text{PV}^{0,75}$) en cabritos.Table 4. Urinary excretion of purine derivatives (PD) ($\mu\text{mol}/\text{PV}^{0,75}$) in kids.

	Allantoína	Ácido úrico	Hypoxantina	Xantina	Total DP
T1	413,2 \pm 15,4 ^a	16,8 \pm 3,3 ^a	11,8 \pm 2,98 ^a	61,0 \pm 3,1 ^a	502,8 \pm 9,2 ^a
T2	488,1 \pm 9,4 ^b	15,2 \pm 2,4 ^a	11,2 \pm 2,1 ^a	54,7 \pm 1,9 ^b	569,2 \pm 8,6 ^b

^{a,b}Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$)

Por otra parte, Jouany *et al.* (1998) no reportaron diferencias en la excreción de DP en ovinos suplementados con *S. cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*. Las diferencias en las especies de microorganismos utilizadas en las mezclas probióticas y prebióticas (sustancias que favorecieron la acción de los probióticos) y sus diversas actividades, pudieran explicar los resultados variables (Ortiz *et al.*, 2009).

Las bacterias *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L. cremoris* y *L. mesenteroides* fueron aisladas del rumen de las cabras canuladas, después del tratamiento con probióticos y en el control. Los conteos totales medios fueron de 1,6 (T1) y 2,4 (T2) millones de ufc/mL en el primer día y aumentaron a 2,5 (T1) y 12,5 (T2) millones de ufc/mL en el séptimo día, con predominio de *Lactobacilli* ($P < 0,05$). Estos resultados son similares a los de Dawson *et al.* (1990), quienes encontraron un aumento significativo en los conteos de bacterias ruminales en novillos que consumieron una dieta de forraje suplementada con un probiótico vivo.

Conclusiones

La adición de BAL a la dieta para cabritos en crecimiento puede incrementar la ganancia de peso vivo, así como se producen cambios favorables en la digestibilidad, la proteína microbiana y la cinética ruminal.

Agradecimientos

La investigación fue financiada por PAPPIT IN200809 y la cátedra CONS-207.

Referencias bibliográficas

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA. p. 600
- Brashears, M.M. *et al.* 2003. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Food Prot.* 66:355
- Chiofalo, V. *et al.* 2004. Effects of the administration of Lactobacilli on body growth and on the metabolic profile in growing Maltese goat kids. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:449
- Couret, V. *et al.* 2004. Number and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Microbiology.* 97:147
- Czarnecki-Maulden, G.L. 2008. Effect of dietary modulation of the intestinal microbiota on reproduction and early growth. *Theriogenology* 70:286
- Dawson, K.A. *et al.* 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392
- Dhanao, M.S. 1988. On the analysis of Dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and Forage Science.* 43:441
- Galina, M.A. *et al.* 2004. Effect of a slow intake urea supplementation on growing kids feed corn stubble or alfalfa with a balanced concentrate. *Small Rum. Res.* 53 (1-2):29
- Galina, M.A. *et al.* 2007. Fattening Pelibuey lambs with sugar cane tops and corn complemented with or without slow intake urea supplement. *Small Rum. Res.* 70:101
- Galina, M. *et al.* 2009. Effect of *Lactobacilli* probiotic supplementation on blood glucose, insulin and NEFA performance of dairy cattle during late pregnancy and early lactation. In: Ruminant Physiology. Digestion, metabolism, and effects of nutrition on reproduction and welfare. Wageningen Academic Publisher. The Netherlands. p. 512

- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). United States Department of Agriculture. Agriculture Handbook. No. 379. Agricultural Research Service. Washington, D.C.
- Hungate, P.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Microbiology. (Norris, J.R., Ribbons, D.W., Eds.). Academic Press, London. p. 117
- Jouany, J.P. *et al.* 1998. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of nitrogen in the rumen of defaunated and refaunated sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75:1
- McDonald, I. 1981. A revised model the estimation of protein degradability in the rumen. *J. of Agric. Sci. Cambridge.* 96:251
- Newbold, C.J. *et al.* 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811
- Nocek, J.E. *et al.* 2002. Ruminal supplementation of direct fed microbial on diurnal pH variation and *in situ* digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:429
- Nocek, J.E. *et al.* 2003. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J. Dairy Sci.* 86:331
- Ørskov, E.R. *et al.* 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production.* 5:195
- Ørskov, E.R. & McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 96:499
- Ortíz, M.A. *et al.* 2009. Effect of a slow nitrogen intake supplementation with or without a lactic probiotic in Pelibuey lamb growth. Nutritional and Foraging Ecology of Sheep and Goats. *Options Méditerranéennes, Serie A.* 85:309
- Patra, A.K. 2007. Nutritional management in organic livestock farming for improved ruminant health and production- An overview. *Livest. Res. Rural Dev.* 19 (3) Article#41. <http://www.lrrd.org/lrrd19/3/part.19041.htm>
- Reid, G. & Friendship, R. 2002. Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Anim. Biotech.* 13:97
- SAS. 1996. User's Guide: Statistics. Version 6.1. SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA.
- Satter, L.D. & Slyter, L.L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 32:194
- Yasuda, K. *et al.* 2007. A new symbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cow. *J. Vet Med Sci.* 69:205

Recibido el 2 de octubre del 2009

Aceptado el 19 de octubre del 2009

Ruminal kinetics and growth of kids supplemented with a lactic acid bacteria probiotic

M.A. Galina¹, M. Delgado-Pertiñez², M.A. Ortiz-Rubio¹, L.J. Pineda³ y D.C. Puga⁴

Abstract

With the objective of evaluating the ruminal kinetics and growth of kids supplemented with a lactic acid bacteria (LAB) probiotic, 86 Alpine animals were assigned to a trial for 120 days. In treatment 1 (T1), 43 kids received a diet constituted by 50% alfalfa hay, 40% commercial concentrate and 10% slow intake nitrogen feed (ID). The animals in treatment two (T2) received ID daily sprayed with 50 mL probiotic (LAB) per kilogram of DM. *In situ* DM disappearance, voluntary DM intake, fiber degradation, NH₃ and VFA concentration, *in vivo* digestibility, ruminal pH, purine derivatives and weight gain were determined. The daily weight gain was 129 and 169 g for T1 and T2, respectively (P<0,05). NH₃ and N and fiber digestibility were higher for T2 (P<0,05). The half-time disappearance of hemicellulose was higher (P<0,05) for T2. The total LAB counts were 1,6 and 2,5 million fcu/mL in T1 on days 1 and 7. The kids in T2 showed 2,4 and 12,5 million fcu/mL. It is concluded that the addition of LAB to the diet for growing kids can increase live weight gain, as well as produce favorable changes in digestibility, microbial protein and ruminal kinetics.

Key words: Lactic acid bacteria, goat kids, probiotics

Introducción

Organic farmers, environmentalists and the scientific community concerned with animal welfare, face challenges in the prevention and control of diseases of domestic animals and the enhancement of production, due to the banning on the use of chemical drugs and feed additives (Patra *et al.*, 2009). In this sense, probiotics constitute an alternative (Ortiz *et al.*, 2009).

Probiotics contain yeasts, lactic acid bacteria, fungi, *Bacillus subtilis* culture, streptococci, and/or their mixture (Nocek *et al.*, 2002; 2003). Lactic acid bacteria, which include the *Lactobacilli* genus, are the most frequently administered probiotic bacteria (Brashears *et al.*, 2003); they are normal residents of the gastrointestinal tract and are often considered natural substitutes of feed antibiotics (Reid and Friendship, 2002).

The animals supplemented with lactic acid bacteria (LAB) probiotics show an increase in the feed utilization efficiency and resistance to diseases (Ortiz *et al.*, 2009). Recently, probiotics and prebiotics have received attention, due to their role in the control of infectious diseases and the improvement of productivity in dairy cattle (Galina *et al.*, 2009). In general, lactic acid-producing bacteria have proven their efficiency as probiotics and have been used as growth promoters, to prevent intestinal infections, decrease stress, stimulate the immune response and increase milk production (Couret *et al.*, 2004; Galina *et al.*, 2009).

Beneficial bacteria, such as *bifidobacteria*, *lactobacilli* and some *enterococci* species, provide intestinal cells with nutrients, which stimulates nutrient absorption, creates a healthy intestinal environment and promotes a vigorous immune system (Czarnecki- Maulden, 2008).

With higher specificity, symbiotics (combinations of prebiotics and probiotics), mixed in the feed, were reported to improve milk production in Holstein cows. In addition, they inhibit the growth of *salmonella* and prevent diarrhea, while increasing the weight gain in calves (Yasuda *et al.*, 2007).

It has been argued that the use of lactic probiotics in ruminants increases ammonia concentrations in the rumen, as well as nitrogen and fiber digestibility, in addition to favoring higher counts of lactobacilli, up to 12,5 million fcu/mL of ruminal content, as compared to the normal quantity of 1,5 million/mL (Ortiz *et al.*,

2009); higher quantities of purines are also recorded. The best performance of the animals fed probiotics can be explained by a decrease of methanogenesis, which preserves the energy for animal development (Ortiz *et al.*, 2009). The production of microbial protein through probiotic bacteria is a technology developed to increase the quantity and quality of the protein and energy delivered to the small intestine (Ortiz *et al.*, 2009).

The objective of this work was to evaluate the ruminal kinetics and growth of kids supplemented with a lactic acid bacteria probiotic.

Materials and Methods

The work was conducted in Querétaro, Mexico. During 120 days, 86 Alpine kids were used, with 20,4 ($\pm 0,5$) kg of body weight (BW), without sex distinction, distributed in a completely randomized design, in two treatments: T1): 43 kids ($20,7 \pm 0,7$ kg BW) fed with an integral diet (ID) of 50% alfalfa hay, 40% concentrate and 10% slow intake nitrogen supplement (SINS) (Galina *et al.*, 2007) and T2): 43 kids ($20,9 \pm 0,4$ kg BW) fed with the ID daily sprayed with 50 mL/kg DM of (LAB) probiotic, formed by a mixture of whey, molasses, urea, ammonium sulphate and a culture of lactic bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidus esscencis* and *Saccharomyces cerevisiae*), diluted in water. The chemical analyses of the feed were carried out according to the methodology of the AOAC (1995), which results are shown in table 1.

The animals were placed in separate pens and remained confined during the experimental period (120 days), with free access to water; the feed was supplied twice a day, at 8:00 and 14:00 h, adjusting the supply to ensure 15% rejection. The kids were monthly weighed; the feed intake was measured three times a week, weighing the feed supplied with regards to the rejected one.

Four fistulated goats were used for studying the ruminal kinetics, under a Latin square design (4 x 2), and they were fed the two evaluated treatments. Each animal had 15 days of adaptation to the diet and five days for sampling.

The *in situ* degradability was determined by the nylon bag technique (Ørskov *et al.*, 1980); Ankom polyester bags, 7x15 cm, 160 pores/cm², with a pore size of 3 mm, were used. In the bags 3 g of corn stubble sample were put as reference forage for the digestibility studies (Galina *et al.*, 2004). The bags were placed in the rumen at intervals of 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. At the end of the incubation time the material was removed from the rumen to be washed for 10-minute periods in a mechanic shaker, until the fluid was transparent; afterwards it was dried at 65°C during 48 hours. In the residual material the DM content and fiber fractions were determined. The bags corresponding to time zero were only washed to determine the quantity of soluble material in the sample. In order to interpret the data the equation suggested by McDonald (1981) and Dhanoa (1988) was used, which emerges from the equation: $P_t = a + b(1 - e^{-ct})$ proposed by Ørskov and McDonald (1979), where:

P_t = equal to Y_t

$Y_t = W_0 + (1 - e^{-c(t-L)})$

Y_t = Loss in time 't', hours

W_0 = washing residues at 0 time; time zero includes the losses due to the washing of soluble material and small particles.

Bd = is the insoluble but potentially degradable material

e = exponential

c = is the constant fractionated rate of the exponential. The exponential is a scale of b , hence b and c together define forage degradation

t = Time

In vivo digestibility. The feces were collected for a period of five days, taking a 25% aliquot for its processing. The feces were dried in a forced-air oven at 70°C for 36 hours, and were stored in airtight bottles for their analysis. DM, N, OM, NDF, cellulose and hemicellulose were determined. In addition, the total excretion of urine was collected for five days, adding sulfuric acid (10%) to maintain pH below 3; afterwards, 100 mL samples were taken and frozen at -20°C until required for the analyses. The passage rate was measured with the Cr-mordant fiber, given through the application of Cr-mordant in the feed and the one recovered in the feces, in a time period of 24 and 48 hours.

Determinations of pH, NH₃ and VFA. Samples of ruminal fluid (50 mL) were extracted at 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 and 22 hours, through a rumen cannula, they were filtered through two gauze layers and kept in a CO₂ pre-gassed thermos flask. In the laboratory, the filtered rumen fluid was immediately transferred into smaller bottles while being gassed with CO₂. The bottles were stored in an incubator at 39°C; the rumen fluid was diluted (10⁶ to 10⁸) and 0,5 mL of each of the three dilutions was inoculated, incubated and the colonies counted following the technique described by Hungate (1969). A subsample of this fluid was used to measure pH with a portable potentiometer; while NH₃ was determined directly, because in aqueous solution ammonia is found in its ionized form (NH₄⁺), through a specific electrode for this ion (Orion trademark). The measurement was carried out at different intervals: 0, 2, 4, 6, 8, 10 and progressively until 96 hours from the first day of the experimental period; it was filtered through three gauze cloths to obtain a sample free from solid particles; in order to avoid the compound loss three to four drops of HCl were added at 0,2 N for every 10 mL of filtered liquid. Total VFA were determined by means of gas chromatography, as well as their molar proportions.

Chemical analysis. The determination of the fiber fractions was conducted following the methodology proposed by Goering and VanSoest (1970), and DM, OM and N, according to the AOAC (1995). The crude energy value (Mcal/kg) of the diets and fecal samples was determined with an adiabatic bomb calorimeter.

Mathematical analysis. The results of the ruminal kinetics were analyzed through a variance analysis and the differences between means were evaluated with Tukey's test (P<0,05); while the test of Student was used to compare the differences of the cannulated goats of diets T1 and T2, with the SAS program (1996).

Results and Discussion

The kids supplemented with probiotic (T2) showed a better growth (p<0,05), manifested in a higher body weight (169 g as compared to 129 g/d for the control kids in diet T1) (table 2). These results are in agreement with the research conducted in growing Maltese goats that received *Lactobacilli*, which had higher body weight gains than the control (Chiofalo *et al.*, 2004). The increases in the degradability rate, microbial protein and fiber digestibility can explain the results. In addition, the DM and N intake was higher in T2 with regards to T1 (P<0,05).

The ruminal pH (table 2) did not show statistical differences between treatments. However, the amount of concentrate (45%) in diet could account for the decrease of pH, due to the formation of VFA which values were 6,2; while the effective utilization of lactic acid could have influenced the moderation of acidity in T2.

The stabilization of pH is generally associated to the decrease of the levels of lactic acid in the rumen. Although the concentration of *Lactobacilli* was increased, which increase the concentration of ruminal lactic acid, it was seemingly used as substratum for the growth of ruminal bacteria that transform lactic acid into propionic acid, with the subsequent moderation of ruminal pH (Galina *et al.*, 2009).

The treatment with LAB probiotic of diet T2 brought about higher concentrations of ruminal ammonia (table 2) as compared to T1.

Satter and Slyter (1974) suggested a concentration of 3-5mg of NH_3 /100 mL of ruminal liquid as optimum to increase the growth of ruminal microorganisms; the results of this work easily cover the suggested requirements of ammonia concentration (14 vs 17 mg/100 mL) in T1 and T2, respectively.

The *in vivo* DM and OM digestibility did not differ between the diets (table 2); in general, the digestibility of alfalfa and the concentrates is high, due to the low contents of the cell wall.

The passage rate of the NDF (K_p /h) was higher ($P<0,05$) in T2 (0,061/h and 0,082/h for T1 and T2, respectively). The true NDF digestibility was higher ($P<0,05$) in T2 (47,73%) with regards to T1 (38,31%) (table 3). In the treatment with probiotics the higher microbial populations of lactic acid bacteria could increase the utilization of fiber (with the increase of passage rate) and DM intake, which was manifested in a higher growth of the kids.

Nocek *et al.* (2002;2003) proved that the treatment with probiotics (lactobacilli and yeast culture) increases the number of cellulolytic bacteria in the rumen and, in some cases increases the degradation of cellulose. In this sense, the digestion rate for hemicellulose was higher in T2 than in T1 ($P<0,05$), while the differences in the digestion rate for cellulose were not significant (table 3). Yet, the true digestibility of cellulose and hemicellulose was higher in T2 as compared to T1 ($P<0,05$). The half-time disappearance ($t_{1/2}$) for hemicellulose was higher ($P<0,05$) in T2 (32,03 h) with regards to T1 (17,37 h), but not for cellulose (table 3).

Newbold *et al.* (1995) suggested that *A. oryzae* and *S. cerevisiae* stimulated the rate rather than the extent of fiber digestion by ruminal microorganisms.

The increase of the use of cellulose and hemicellulose was probably due to a higher degradation of the cell walls, because of the boost in ruminal microbial population, and the action of lactic bacteria. However further studies are needed about the specific effect of lactic bacteria on fiber digestion in goats.

Purine derivatives excretion (PD) in urine ($\mu\text{mol}/\text{W}^{0.75}$) was affected ($P<0.05$) by the addition of the lactic probiotics to diet T2 (table 4). Although no available information has been found about the effect of lactic bacteria on the PD excretion in goat kids, it could explain the increase of lactic bacteria, which was proven by a boost of the digestible microbial protein in the intestine.

Bacterial protein could be a large portion of the total protein needed by a ruminant when it improves microbial fermentation (Galina *et al.*, 2007; Galina *et al.*, 2009) as it was proven above.

On the other hand Jouany *et al.* (1998) reported no differences in PD excretion in sheep supplemented with *S. cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*. The differences in the microorganism species used in probiotic and prebiotic mixtures (substances that favored the action of the probiotics) and their diverse activities could account for the variable results (Ortíz *et al.*, 2007)

The bacteria *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L. cremoris* and *L. mesenteroides* were isolated from the rumen of the cannulated goats after probiotic treatment and in the control. The mean total counts were 1,6 (T1) and 2,4 (T2) million fcu/ml on the first day and increased to 2,5 (T1) and 12,5 (T2) million fcu/mL on the seventh day, with predominance of *Lactobacilli* ($P<0,05$). These results are similar to those obtained by Dawson *et al.* (1990), who found a significant increase in ruminal bacteria counts in steers on a forage diet supplemented with a live probiotic.

Conclusions

The addition of LAB to growing kids can increase the live weight gain, as well as produce favorable changes in digestibility, microbial protein and ruminal kinetics.

Acknowledgements

The research was funded by PAPPIT IN200809 and the chair CONS-207.